

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Elin Madli Peets

PepFect14 vahendatud nukleinhapete transport maksa rakkudesse geeni vaigistamiseks

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Juhendajad MSc Kadi-Liis Veiman

PhD Kaido Kurrikoff

TARTU 2015

Sisukord

Sisukord.....	2
Kasutatud lühendid	4
Sissejuhatus	5
1. Kirjanduse ülevaade	6
1.1 Geeniteraapia.....	6
1.1.1 RNA interferents	6
1.1.2 shRNA ja siRNA.....	7
1.1.3 siRNA kasutamise piirangud ja väljakutsed	8
1.1.4 Transfektsioon.....	9
1.1.5 Geeniteraapia maksas	10
1.2 Transportvektorid nukleiinhapete viimiseks rakku	10
1.2.1 Viiruslikud vektorid	10
1.2.2 Mitteviiruslikud vektorid.....	11
1.3 Rakku sisenevad peptiidid	12
1.3.1 Transportaan10	13
1.3.2 PepFectid	13
1.4 Mudelsüsteemi loomine maksas.....	14
1.4.1 Hüdrodünaamiline süst.....	14
1.4.2 Reportergeen sekreteeritav embrüonaalne aluseline fosfataas	15
1.4.3 pLIVE plasmiid.....	15
2. Eksperimentaalne osa.....	17
2.1 Töö eesmärgid	17
2.2 Materjalid ja metoodika	18
2.2.1 Kasutatud rakuliinid	18
2.2.2 Kasutatud peptiid	18
2.2.3 Komplekside moodustamine	18
2.2.4 pDNA/peptiid kompleksidega transfektsioon rakukultuuris	19
2.2.5 SEAP ekspressiooni mõõtmine.....	19
2.2.6 siRNA/peptiidi kompleksidega topeltransfektsioon	20
2.2.7 Rakkude elulemuse hindamine	20
2.2.8 Reportergeeni ekspresseerimine maksas	21
2.2.9 Vereproovide kogumine ning SEAPi aktiivsuse mõõtmine	21

2.3 Tulemused	22
2.3.1 Transfektsiooni efektiivsus erinevates rakuliinides pSEAP/PF14 partiklitega	22
2.3.2 Topelttransfektsiooni efektiivsus PF14/pSEAP partikleid kasutades	23
2.3.3 Reportergeeni mahasurumine hiire maksas	24
2.3.4 Geeni SEAP mahasurumine pshSEAP ga hiire maksas	25
2.4 Arutelu	26
Kokkuvõte	28
Summary	29
Tänuõnad	30
Kasutatud kirjandus	31
Kasutatud veebiaadressid	36
Lihtlitsents	37

Kasutatud lühendid

CR	<i>Charge ratio</i> , laengu suhe
dsRNA	<i>Double-stranded RNA</i> , kaheahelaline RNA
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> , veise loote seerum
Hep3B	Inimese maksa kartsinoomi rakud
LF2000	Kommertsiaalne transfektsioonireagent Lipofectamine TM 2000
miRNA	mikroRNA
MR	Molaarsuhe
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> , fosfaatpuhverdatud füsioloogiline lahus
pDNA	Plasmiidne DNA
PEI	Polüetüleenimiin
PF14	PepFect14
PLAP	Platsenta aluseline fosfataas
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i> , RNA-indutseeritud vaigistus-kompleks
RNAi	RNA interferents
RSP	Rakku sisenev peptiid
SEAP	Sekreteeritav embrüonaalne aluseline fosfataas
shRNA	<i>Small hairpin RNA</i> , väike juuksenõela struktuuriga RNA
siRNA	<i>Short interfering RNA</i> , lühike interfereeruv RNA
TP10	Transportaan10
U87	Inimese glioblastoomi rakud
UT	<i>Untreated cells</i> , töötlemata rakud

Sissejuhatus

Geeniteraapia on meetod ravimaks erinevaid haiguseid geneetilisel tasemel. Seni on aga suurimaks miinuseks olnud nukleiinhapete puudulik transport, sest nukleiinhapped ei ole võimelised oma suuruse ja laengu tõttu läbima iseeneslikult rakumembraani. Kasutusele on võetud erinevad transportvektorid – viiruslikud ja mitteviiruslikud.

Kuigi viiruslikud vektorid sisenevad edukalt rakkudesse ja võimaldavad transporditud geneetilisel materjalil rakus avalduda, võivad nad põhjustada immuunreaktsiooni ning sisestatav geneetiline materjal on piiratud suurusega.

Vältimaks viiruslike vektorite puudusi, on keemiliselt loodud uued transportvektorid. Üheks selliseks vektorite klassiks on rakku sisenevad peptiidid (RSP), mis suudavad rakku siseneda ning transportida erinevaid ühendeid, näiteks valke, plasmiidset DNAd (pDNA) ja RNAd. Loodud peptiidid on 5 – 30 aminohappe pikkused ning katioonsete ja/või amfipaatsete omadustega.

Antud töös oli eesmärgks luua maksaspetsiifiline mudel, kus kasutades rakku sisenevat peptiidi PepFect14 (PF14) ning sidudes seda pDNA või lühikese interfereruva RNaga (siRNA) vaigistatakse reportergeeni ekspressioon maksas. Töös esitatud katsed viidi läbi Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi molekulaarse biotehnoloogia laboris.

Märksõnad: rakku sisenev peptiid, PepFect14, siRNA, geeniteraapia, plasmiidne DNA

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Geeniteraapia

Mitmete pärilike ja omandatud haiguste põhjuseks on mutatsioon DNAs, mille tagajärjel on geen defektne või puudub geenist oluline osa. Selle probleemi üheks lahendamise võimaluseks on geeniteraapia, mis põhineb nukleiinhapete kasutamisel ravimolekulina. Sõltuvalt haigusest viiakse organismi kas funktsionaalne geen, mis asendab defektse või puuduva osa geenis või takistatakse kahjuliku valgu ekspresseerumist (Kaufmann jt., 2013).

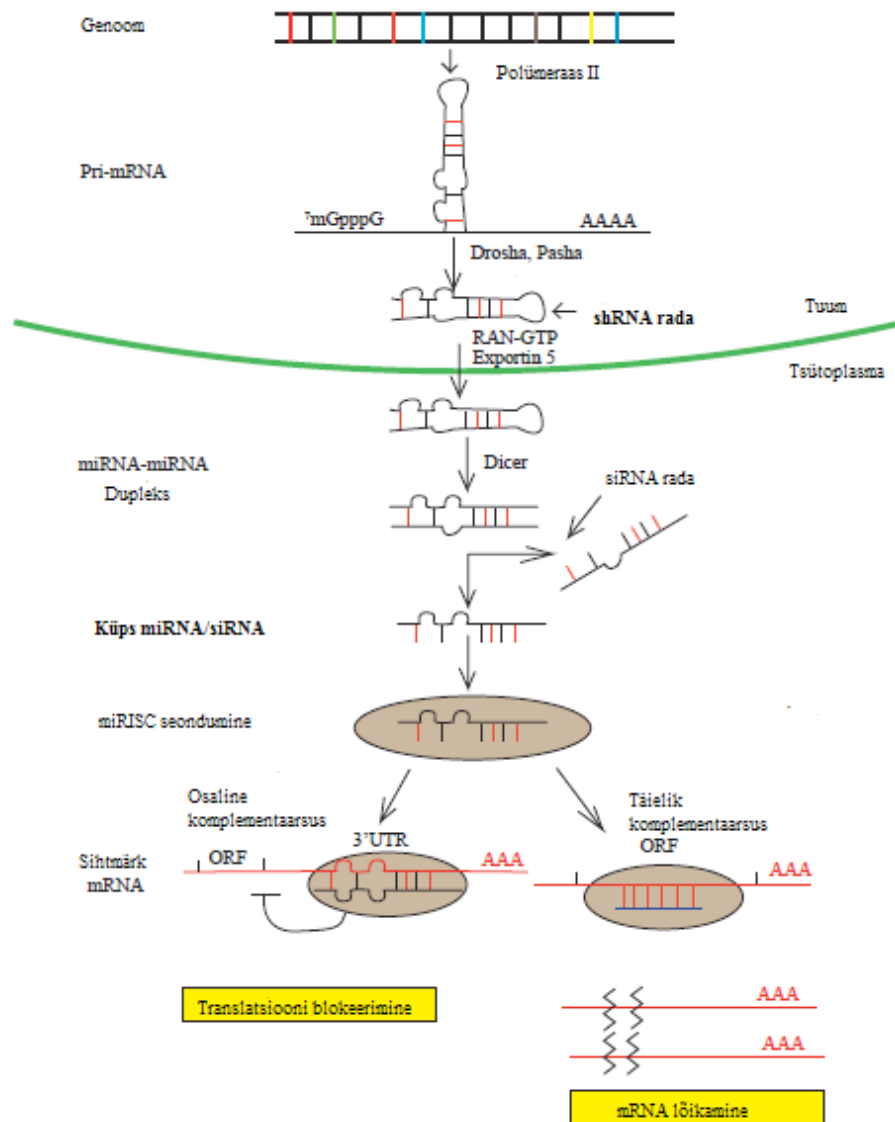
Haiguste raviks on võimalik kasutada ka valguteraapiat. Valguteraapiat kasutatakse näiteks diabeedi puhul, kus süstitakse insuliini, mis on seotud glükoosi metabolismiga (Leader jt. 2008). Valguteraapia miinuseks on valkude ebastabiilsed ja nad võivad laguneda vereringes erinevate ensüümide tõttu ning samuti lagundatakse nad kiiresti neerudes ja maksas (Han jt., 2000). Seetõttu on geeniteraapia, kus geen viiakse rakku efektiivsem, sest valku toodetakse pikemat aega ning seda toodetakse seal, kus seda vaja on (Ledley ja Shapiro Ledley, 1998).

Selleks, et nukleiinhappe molekul jõuaks vajalikku rakku/organisse, peab kasutama transportvektorit, et takistada vereringes ensüümide poolt lagundamist. Samuti peab transportvektor suutma läbida sihtmärgi rakumembraani ilma, et toimuks interaktsioon veresoonte endoteeli rakkude või verega ega aktiveeruks immuunsüsteem. Olemasolevad vektorid jagatakse kahte rühma vastavalt nende päritolule: viiruslikud ja mitteviiruslikud vektorid (Ibraheem jt., 2014).

1.1.1 RNA interferents

RNA interferents (RNAi) on posttranskriptsiooniline geeni vaigistamine, mis toimub eukarüootsetes rakkudes. RNAi pakub võimalusi geenide reguleerimiseks ja vaigistamiseks. RNA-d, mis võivad olla nii endogeenset kui eksogeenset päritolu ja võtavad osa RNAi rajas, on mikroRNA-d (miRNA), väikesed interfereerivad RNA-d (siRNA) või lühikesed juuksenõela struktuuriga RNA-d (shRNA). siRNA-d on lühikesed 19–30 nukleotiidi pikkused kaheaheelised RNAd (dsRNA), mis on võimelised vahendama komplementaarse mRNA lagundamist tsütoplasmas. siRNA seondub RNA-indutseeritud geenivaigistamiskompleksiga (RISC), kus ahelad harutatakse lahti ning üks ahel seondub mRNA komplementaarse ahelaga ja teine ahel lagundatakse (Carthew ja Sontheimer, 2009). Seondunud ahel vaigistab geeni

ekspressiooni, lagundades komplementaarse mRNA ja/või blokeerides mRNA translatsiooni (joonis 1) (Wang *jt.*, 2010).



Joonis 1. RNAi rada. siRNA seondub raku tsütoplasmas RISC kompleksis mRNAga. Järgneks translatatsiooniline blokeerimine osalise komplementaarsuse puhul või mRNA lõikamine täieliku komplementaarsuse puhul (Deng *jt.*, 2014).

1.1.2 shRNA ja siRNA

shRNA on RNA järjestus, mis sünteesitakse plasmiidilt või genoomilt ning mille transkriptsioon sõltub RNA polümeraas III-st ja promootorist. Sünteesitud RNA ahel on 50-100 nukleotiidi pikk ning selle komplementaarsed alad seonduvad ning moodustub juuksenõela struktuur. RNAi süsteem tunneb ära tekkinud struktuuri ning lõikab seda moodustades siRNA (McIntyre ja Fanning, 2006; Wang *jt.*, 2010).

Eksogeenne siRNA on organismi väline siRNA ehk teraapiaks kasutatav siRNA, endogeenne siRNA on organismi enda poolt sünteesitud siRNA, mida organism kasutab geeniekspressiooni reguleerimiseks. Tsütoplasmas lõigatakse Diceri ensüümi abil pikad dsRNA ahelad siRNA-deks. RISC sisaldab Argonaut 2 (Ago-2) ensüümi, mis lagundab ühe siRNA ahela. Selle tulemusena aktiveeritakse RISC, mis viib sihtmärgi mRNA ära tundmiseni komplementaarsuse alusel. Ago-2 lõikab mRNA-d 10 ja 11 aluspaari vahelt 5' otsast, mis põhjustab mRNA lagundamise (Carthew ja Sontheimer, 2009).

1.1.3 siRNA kasutamise piirangud ja väljakutsed

Kuigi RNAi on väga suure potentsiaaliga, siis siRNA kasutamine kliinilisteks rakendusteks on piiratud. Modifitseerimata siRNAde eluiga on lühike ja geeni vaigistamisel *in vivo* tingimustes kestab vaid mõne päeva, mis on vähe, võrreldes teiste RNAi-s osavõtvate RNA-dega. Lühikese eluea põhjustavad siRNA-t lagundavad seerumis olevad endonukleaasid (Wang jt., 2010). siRNAde eluea pikendamiseks kasutatakse erinevaid modifitseerimisstrateegiaid. Näiteks on loodud terve rida erinevate keemiliste modifikatsioonidega nukleiinhappe analooge, millel on suuremal või vähemal määral säilinud komplementaarsuse alusel hübridiseerumisevõime ning mis on palju resistentsemad nukleassele mõjule. Seni on proovitud muuta siRNA suhkur-fosfaat selgroogu, asendada nukleoaluseid ning modifitseerida RNA sensahelat, mis on muutnud siRNA stabiilsemaks (Guo jt., 2010).

Kuna siRNA järjestused on lühikesed, siis on võimalik, et lisaks oma sihtmärk mRNA molekulile võib leiduda neile täielikult või osaliselt komplementaarseid järjestusi ka teistel mRNAdele. Selle tulemusena võidakse vaigistada mRNA, mis ei olnud sihtmärk – sellist olukorda nimetatakse kõrvalefektiks (Rao jt., 2009). Selle vältimiseks on vajalik põhjalik siRNA disain, et vältida valet seondumist. Üheks kasutatud meetodiks on siRNAs riboosi 2' rühma modifitseerimine metüüliga, mis takistab siRNA seondumist osaliselt komplementaarsetele mRNAdele, kuid ei mõjuta sihtmärk mRNA-d (Jackson jt., 2006).

Eksogeenne dsRNA võib põhjustada immuunvastust seondudes Toll-sarnaste retseptoritega ja proteiin kinaas retseptoritega (Deng jt., 2014). Kindlad GU-rikkad järjestused põhjustavad põletikuliste tsütokiinide tootmist, lisaks võivad pikad dsRNA ahelad aktiveerida interferoone, mis on mõeldud viiruslike patogeenide vastu võitlemiseks (Wang jt., 2010). Interferoonide ja tsütokiinide aktiveerimise vältimiseks kasutatakse uridiini ja guanosiini modifitseerimist 2'-O-metüül rühmaga või siRNA seondamist transportvektoriga, näiteks

polüetüleenimiiniga (PEI), mis peidab ära siRNA järjestused tiheda pakkimise tõttu ja teised molekulid ei pääse siRNAle ligi (Judge jt., 2006).

siRNA kasutamise suurimaks väljakutseks on tema õigesse rakku toimetamine. Rakku toimetamise teeb keeruliseks siRNA-de negatiivne laeng ja suur molekulmass ning seetõttu ei ole need võimelised iseeneslikult läbima rakumembraani. siRNA transportimiseks õigesse rakku/koesse kasutatakse transportvektoreid, mis on kohaspetsiifilised (Deng jt., 2014).

shRNA eeliseks siRNA ees on suurem stabiilsus organismis, sest shRNAd on võimalik transportida plasmiidides ekspressioonivektoris, millest hakatakse rakus shRNAd tootma. Suurema molekuli tõttu on aga plasmidi raskem toimetada rakku ning RNA transkriptsiooniks peab molekul jõudma rakutuumas. Kui sellest probleemist üle saada efektiivse vektori abil, on shRNA püsivam tänu rakusisesele paljundamisele transkriptsiooni abil (McAnuff jt., 2007).

1.1.4 Transfektsioon

Transfektsioon on protseduur, mille abil viiakse nukleiinhappeid peamiselt eukarüootsetesse rakkudesse. Sõltuvalt nukleiinhappest püsib materjal rakus kas püsivalt või kaob aja jooksul. Nukleiinhapped võivad kaduda rakust keskkonna faktorite ja raku jagunemise tõttu. Transfektsiooni üheks rakenduseks on geenide funktsiooni uurimine läbi geeniekspressiooni muutmise (Kim ja Eberwine, 2010).

Transfektsiooni saab jaotada meetodite alusel kolmeks: füüskaliseks, keemiliseks ja bioloogiliseks. Füüskalise transfektsiooni alla kuulub mikrosüst, elektroporatsioon ja laseripõhine transfektsioon. Füüskalise meetodi eeliseks on sõltumatus raku keemilistest ja bioloogilistest omadustest, mistõttu saab seda meetodit kasutada erinevatel rakuliinidel (Kaestner jt., 2015).

Keemiline meetod on enim kasutatud moodus transfekteerimiseks. Siia kuuluvad katioonsed polümeerid, katioonsed lipiidid, kaltsiumfosfaat ja katioonsed aminohapped. Positiivselt laetud keemilised ühendid moodustavad kompleksid negatiivselt laetud nukleiinhapetega. Transfektsiooni efektiivsust mõjutavad lahuse pH, rakumembraani koostis ja nukleiinhappe/kemikaali suhe.

Bioloogiline meetod on viiruste kasutamine rakkudesse geneetilise materjali viimiseks. Sellist meetodit nimetatakse ka transduktsiooniks (Kim ja Eberwine, 2010).

1.1.5 Geeniteraapia maksas

Maks on organismi põhiline metaboolne organ, mis vastutab mitmete ainete sünteesi ning lagundamise eest. Maksas toimub glükoosi ja rasvhapete metabolism, samuti sünteesitakse mitmeid erinevaid valke, näiteks albumiini ja verehüübefaktoreid. Maksas lagundatakse kahjulike aineid, valke ja hormone. Erinevate funktsioonide tõttu on maks väga oluline organismi homöostaasis (Grijalva ja Vakili, 2013).

Molekulaarsel tasemel on selgeks tehtud mitmete maksa haiguste põhjused, kuid nende ravi on olnud kesine, mistõttu on vaja uusi alternatiivseid lahendusi. Mitmeid haigusmudeleid on geeniteraapiaga proovitud ravida *in vitro* ja *in vivo* mudelites. Üks efektiivsemaid teraapiaid on rakendatud alfa 1-antitrüpsiin puudulikkuse puhul, mis on retsessiivne haigus, mille puhul ei toodeta funktsionaalset valku. Seetõttu väheneb valgu tase kopsudes ning maksas suureneb defektse raku kogus. Selle tulemusena tekib kopsuemfüseem ja võib tekkida maksatsirroos. Seni on tsink-sõrmede ning *piggybac* tehnoloogiat rakendades Yusa jt suutnud asendada punktmutatsiooni ning rakkudes on taastunud korrektne struktuur ja funktsioon. Kasutatud meetodi eeliseks on võõrDNA puudumine, mistõttu ei satu peremehe genoomi võõrmaterjali (Yusa jt., 2011).

Pompe'i tõbi esineb umbes ühel inimesel 40 000-st ning vajab ravi geneetilisel tasandil. Pompe'i tõbi on põhjustatud mutatsioonist happelise alfa glükosidaasi geenis, mis vastutab glükogeeni glükoosiks muutmise eest, mis toimub maksas. Haigus esineb kas looteas või esimesel elukuul. Seni on suudetud saada hiirtes lubavaid tulemusi kasutades viirusvektoreid, kuid viirusvektorid põhjustavad tugevat immuunreaktsiooni, mistõttu on vaja uut alternatiivi (Domvri jt., 2012)

Viimaseks tuleks mainida, et maks on geeniteraapia oluliseks sihtmärkorganiks ka päris proosalisel põhjusel, nimelt mitmed nukleiinhapete transportvektorid suudavad eelistatult viia geneetilise materjali just maksakoesse. Seetõttu on erinevaid prekliinilisi haigusmudeleid ja kliinilisi ravikatsetusi läbi viidud just maksahaiguste mõjutamiseks (Jacobs jt., 2012).

1.2 Transportvektorid nukleiinhapete viimiseks rakku

1.2.1 Viiruslikud vektorid

Viirused on võimelised sisenema raku tuuma ning kasutama raku ensüüme enda elutegevuseks. Selleks, et viirust kasutada transportvektorina peab eemaldama patogeensed

osad ning asendama need teraapiaks vajalike geenidega. Viirusele jäävad alles geenid, mis vastutavad rakku sisenemise ning organismis paljunemise eest.

Peamised viirused, mida teraapias kasutatakse, on retroviirused, adenoviirused ja herpes simplex viirus. Retroviiruse puhul on genoomiks ssRNA molekul, mis rakus transkribeeritakse dsDNA molekuliks, mis seejärel integreerub peremees genoomi suvalises kohas ning tagab püsiva geeniekspressiooni. Retroviirus on võimeline nakatama ainult jagunevaid rakke. Miinuseks retroviiruse puhul on integreerumine genoomi reguleerimise alasse, mis võib põhjustada vale reguleerimise transkriptsiooni tasandil. Adenoviirused nakatavad respiratoorsüsteemi ning nende genoom on dsDNA, mis ei integreeru peremehe genoomi vaid jääb episoomina rakku. See tähendab, et rakujagunemise käigus kaob ta rakkudest ega ole püsiv. Herpesviirusega saab nakatada närvirakke ning genoom jääb sinna episoomina püsima (Dubé ja Cournoyer, 1995).

Kuigi viirusvektorid on efektiivsed nukleiinhapete transpordis, on nende puuduseks immuunsüsteemi võimalik aktiveerumine, sisestatava geeni piiratud suurus ning asjaolu, et vektorite suurel määral tootmine on kulukas ja keeruline. (Kaufmann *jt.*, 2013).

1.2.2 Mitteviiruslikud vektorid

Mitteviiruslikud vektorid loodi, et vältida viiruslike vektorite puudusi – nad põhjustavad vähest immuunsüsteemi aktivatsiooni, neid on lihtsam ja odavam toota suurtes kogustes ning transporditava nukleiinhappe kogus on suurem. Lisaks on säilitamine lihtsam, sest mitteviiruslikud vektorid on stabiilsed. Puuduseks on aga oluliselt madalam transfektsiooni efektiivsus võrreldes viiruslike vektoritega (Ibraheem *jt.*, 2014).

Nukleiinhappe transportimise põhjal saab mitteviiruslikke vektoreid jaotada kahte rühma. Esiteks, füüsikalised meetodid, mis võimaldavad DNA viia rakku ilma vektorit kasutamata, nõrgestades rakumembraani ja muutes selle DNA jaoks kergemini läbitavamaks. Nõrgestamiseks kasutatakse elektrilist, mehhaanilist, hüdrodünaamilist või laseripõhist energiat (Gao *jt.*, 2007).

Teiseks meetodiks on keemiliste vektorite kasutamine. Need vektorid varjavad nukleiinhappe negatiivse laengu, kaitsevad seda lagunemise eest ning moodustavad kompleksi kondenseerides DNAd (Ibraheem *jt.*, 2014). Üheks levinud mitteviiruslikuks vektoriks on katioonsed polümeerid, mis omavad rohkelt positiivseid laenguid ning seetõttu moodustavad elektrostaatiliste jõudude tõttu kompleksid DNAGA. Nii lineaarsete kui

hargnenud struktuuridega on välja töötatud näiteks PEI ja polü-L-ornitiin. Nende vektorite miinuseks on vähenenud efektiivsus ja toksilisus (Gao jt., 2007).

Lipopleksid on katioonsed lipiidid, mis moodustavad komplekse DNAGA. Lipiid koosneb kolmest osast: positiivse laenguga pearühmast, mis seondub DNAGA, hüdrofoobsest ankrust, mis võimaldab kompleksil siseneda rakku ning linkerist, mis seob eelnevad kaks osa omavahel ning määrab tekkinud kompleksi stabiilsuse (Gao ja Hui 2001). Lipoplekside puuduseks on aktiivsuse kadumine seerumis ning interaktsioon vere komponentidega, mistõttu võivad tekkida suured agregaadid (Gao jt., 2007).

1.3 Rakku sisenevad peptiidid

Rakku sisenevad peptiidid (RSPd) on 5–30 aminohappe pikkused, enamasti katioonsed ja/või amfipaatset peptiidid, mis on võimelised siseneda rakku vähesel toksilisusega (Mäe ja Langel, 2006). RSP-sid saab kasutada geeniteraapias, kui need siduda nukleiinhappega ning rakkudesse viia (Bechara ja Sagan, 2013).

RSP-sid võib jaotada erinevatesse rühmadesse nende saamise alusel. Esimene rühm on looduslikud peptiidid, mille järjestused on tuletatud looduses esinevate valkude järjestustest. Teine rühm on kimaärsed peptiidid, kus kasutatakse looduses esinevaid järjestusi ning kahest erinevast järjestusest sünteesitakse kokku üks. Kolmas rühm peptiide on sünteetilised ning nende järjestusi looduslikult ei esine. Sünteetilistest peptiididest on kõige paremini uuritud polüarginiine. (Mäe ja Langel, 2006)

Peptiide võib lastiga siduda kovalentselt ning mittekovalentselt. Kovalentselt seotakse peptiidide külge antikehi, fluorestseeruvaid ühendeid ning ravimeid. Mittekovalentset komplekseerimisstrateegiat kasutatakse peamiselt positiivset laengut kandvate RSPde puhul, sest nad on võimelised komplekseerima negatiivselt laetud nukleiinhappeid, seal hulgas pDNA-d ja siRNA-d (Regberg jt., 2014). Mittekovalentset komplekseerimist kasutades on võimalik läbi viia efektiivset transfektsiooni madalamal nukleiinhappe kontsentratsioonidel (Ezzat jt., 2011).

Võivad moodustuda kompleksid, millel on positiivne laeng, mis võimaldab rakku siseneda läbi negatiivse rakumembraani. (Mäe ja Langel, 2006). Rakku siseneda võib toimuda ka läbi rakupinna retseptorite ja valkude, mille abil sisenevad kompleksid endotsütoosi (Regberg jt., 2014).

RSP-d on võimelised iseseisvalt rakku sisenema läbi rakumembraani, kuid teatud RSP-d koos lastmolekuliga saavad siseneda rakku kasutades kas endotsütoosi mehhanismi või liikudes läbi rakumembraani. Enamik RSPsid vajavad rakuga interakteerumiseks proteoglükaane ning rakkudel, millel puudub hepariin sulfaat on RSP sisenemine oluliselt madalam (Lundin jt., 2008).

Rakkudesse endotsütoosi teel sisenemise peamiseks takistuseks on nanokomplekside kinnijäämine endosoomidesse, mille tulemusena endosomaalse küpsemise käigus jõuavad kompleksid lüsoosoomidesse, kus toimub järsk pH muutus, samuti on seal palju lagundavaid ensüüme, mille tulemusena transporditav materjal lagundatakse. Geeni vaigistamiseks on siRNA-l vaja vabaneda endosoomist tsütoplasmasse, kus asub RNAi jaoks vajalik RISC kompleksi komponendid. Endosoomist vabanemise suurendamiseks on vaja modifitseerida transportvektorit (Deng jt., 2014).

1.3.1 Transportaan10

Transportaan on RSP, mis saadi aastal 1998 Langeli uurimisrühma poolt ning on 27 aminohappe pikkune kimäärne peptiid (tabel 1). See sisaldab 12 aminohapet neuropeptiidist galaniini ja 14 aminohapet peptiidist mastoparaan, mis pärineb herilase mürgist. Transportaan siseneb mitmetesse erinevatesse rakuliinidesse ega ole spetsiifiline ühelegi kindlale rakutüübile (Pooga jt., 1998a). Transportaaniga on rakkudesse viidud erinevaid lastmolekule, näiteks peptiidseid nukleiinhappeid (Pooga jt., 1998b).

Transportaan 10 (TP10) on 21 aminohappe pikkune amfipaatne peptiid (tabel 1), mis loodi modifitseerides transportaani, sest transportaan sisaldas lõiku galaniinist ning sellest tulenevalt oli transportaan galaniini retseptorite poolt ära tuntav. Lisaks inhibeeris transportaan GTPaaside tegevust ning peptiidi efektiivseks kasutamiseks oli vaja kõrgeid kontsentratsioone. TP10 on saadud kuue aminohappe eemaldamisega aminotermiinaalsest otsast. TP10 sisaldab positiivselt laetud aminohappeid ning negatiivsete laengutega aminohapped puuduvad. Lisaks on peptiidis veel neli lüsiini, seega on kogu peptiidi laeng +5 neutraalse pH juures (Soomets jt., 2000). TP10-ga viidi plasmiid rakkudesse ning ka kõrgetel kontsentratsioonidel ei olnud see toksiline rakkudele (Kilk jt., 2005).

1.3.2 PepFectid

Langeli laboris on loodud rida TP10 analooge, mis kõik on disainitud spetsiifilise eesmärgiga transportida nukleiinhappeid mittekovalentse komplekseerimise põhimõttel. TP10 aminotermiinaalsesse otsa lisati stearüülrühm ning saadud peptiid nimetati PepFect3-ks. PF3 moodustab samuti mittekovalentselt komplekse nukleiinhapetega, kuid stearüülrühma tõttu on

tekinud partiklidel lihtsam pääseda endosoomidest tsütoplasmasse nii *in vitro* kui *in vivo* tingimustes. (Lehto jt., 2011)

PepFect 14 (PF14) on stearüül-TP10-l põhinev peptiid, kuid selle järjestuses on lüsiinid muudetud ornitiinideks ja leutsiinid muudetud isoleutsiinideks. Lüsiin-ornitiin asendus viidi läbi, kuna eelnevalt oli näidatud suuremat transfektsiooni efektiivsust, sest muudetuna on peptiid võimeline seostuma kõrgema afiinsusega DNA-le ning moodustama madalama laengu suhtega stabiilseid nanopartikleid (Ramsay ja Gumbleton, 2002). Lisaks sellele püstitati hüpotees, et kuna ornitiin ei ole standardne aminohape, siis see võib vähendada seerumis leiduvate proteaaside seondumist RSP-ga või äratundmise. Tõepoolest, PF14 on aktiivne ka seerumit sisaldavas söötmes (Ezzat jt., 2011).

Tabel 1. Kasutatud peptiidid ja nende järjestused

Peptiid	Järjestus	Aminohappeline pikkus
Galaniin	GWTLNSAGYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS	30
Mastoparaan	INLKALAALAKKIL	14
Transportaan	GWTLNSAGYLLGKGINLKALAALAKKIL-NH ₂	27
Transportaan10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂	21
PepFect3	Sterüül-AGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂	21
PepFect14	Sterüül-AGYLLGKLLOOLAAAALLOOLL-NH ₂	21

1.4 Mudelsüsteemi loomine maksas

1.4.1 Hüdrodünaamiline süst

Puhaste nukleiinhapete manustamist organismidesse kasutatakse geeniekspressiooni uurimiseks. Üheks mooduseks on hüdrodünaamiline süst, mis tähendab, et puhast pDNA-d süstitakse sabaveeni koos suure koguse vedelikuga. Sellist meetodit kasutatakse nii hiirte ja rottide kui ka koerte ja primaatide puhul. Hüdrodünaamilise süstiga on võimalik saavutada efektiivne nukleiinhapete transport maksarakkudesse. Näiteks pDNA kujul geeniekspressioonivektorite manustamisel saavutatakse geeniekspressioon hepatotsüütides. siRNA manustamisel on võimalik saavutada sihtmärk-geeni mahasurumine maksa piires (Zhang *et al.*, 1999).

Süstitakse korraga ja lühikese aja jooksul rohke vedelikuga kõrge rõhu all. Seetõttu suurenevad sinusoidsed avaused, mis suurendavad pDNA transporti hepatotsüütidesse.

Süstitud vedelik transporditakse maksa, sest süstimise käigus tekib põgus südamepuudulikkus ning südamelöökide sagedus aeglustub, samal ajal suureneb õõnesveeni rõhk ja südamevatsakese suurus. Südame suurenemise tõttu täitub maksa veen süstitud pDNA lahusega (Crespo jt., 2005). Süstides sama koguse pDNA madala rõhu juures seondub vähem DNA maksas ning hepatotsüütide asemel on seda rohkem Kupfferi rakkudes (Sebestyén jt., 2006). Antud töös on kasutatud hüdrodünaamilist pDNA transporti, et indutseerida reportergeeni tasemed maksas. See võimaldab uurida maksaspetsiifilist geenivaigistamist kasutades SEAP-vastaste siRNA ning shRNA transporti PF14 vahendusel.

1.4.2 Reportergeen sekreteeritav embrüonaalne aluseline fosfataas

Reportergeen on geen, mis ekspresseerib valku, mida saab lihtsa metodoloogiaga kas kvantitatiivselt mõõta või kvalitatiivselt jälgida. Neid kasutatakse väga erinevateks rakendusteks, näiteks võimaldab reportergeeni koekspresseerumine uuritava geeniga kaudselt mõõta meid huvitava geeni avaldumist. Reportergeen peab olema lihtsalt mõõdetav ning rakud ei tohi ise sellest eristamatut uuritavat valku ekspresseerida. (Cullen, 2000)

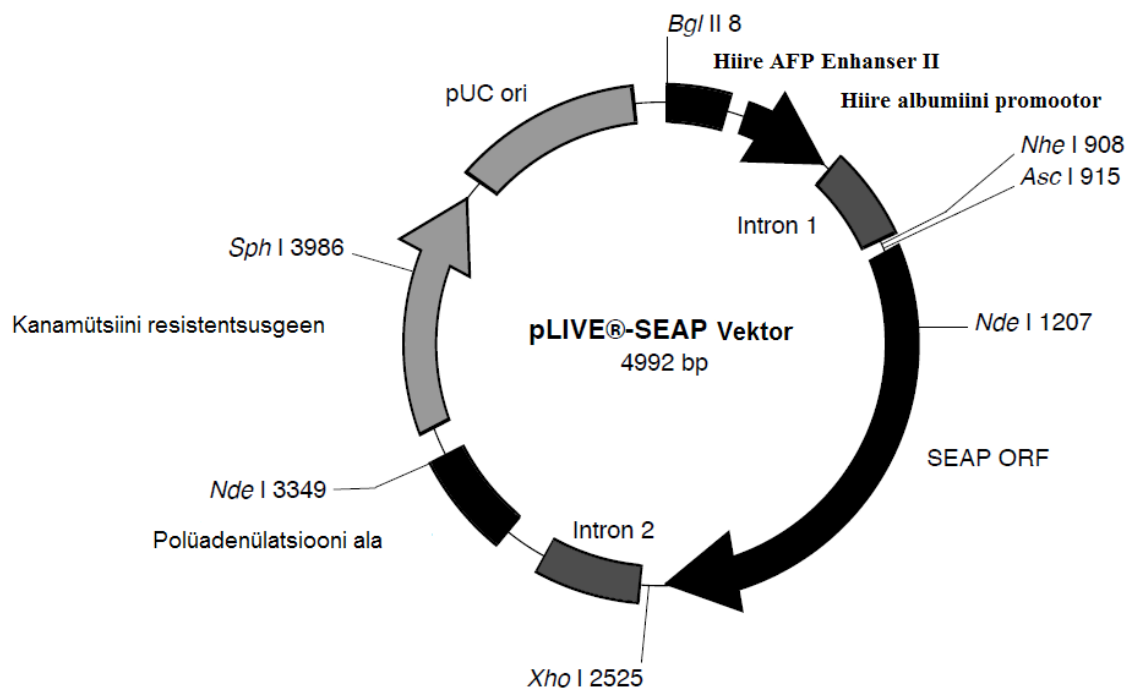
Aluseline fosfataas on hea reporter, sest ta on stabiilne ensüüm ning omab kõrget afiinsust substraadi suhtes (Miska ja Geiger, 1987). Puuduseks on see, et mitmed rakud toodavad aluselist fosfataasi ja see suurendab taustasignaali. Probleemi lahendamiseks kasutati platsenta aluselist fosfataasi (PLAP), mida ekspresseeritakse loomulikult vaid kõrgemate primaatide platsenta rakkude pinnal. PLAP on kuumastabiilne ja kannatab 65°C töötlust ning ei ole mõjutatud homoarginiini poolt, mis inhibeerib teiste aluseliste fosfataaside tööd. PLAP geeni modifitseeriti stoppkoodoni lisamisega peale 489ndat aminohapet, mis võimaldas muuta valgu rakust sekreteeritavaks. Uue konstrukti nimeks sai sekreteeritav embrüonaalne aluseline fosfataas (SEAP) ning tal on mitmeid eeliseid mitte-sekreteeritava PLAPi ees. (Berger jt, 1988). Esiteks võimaldab SEAP kasutada ühte rakukultuuri mitmeks mõõtmiseks, sest ei ole vajalik rakke lüüsida valgu kättesaamiseks. Lisaks jõuab SEAP maksimaalsele ekspressioonitasemele 48-72 tunniga ning on stabiilne 37°C juures (Cullen, 2000). SEAPi poolväärtusaeg hiire veres on umbkaudu 2 tundi (Hiramatsu jt 2006). SEAPi saab mõõta kolorimeetriliselt ja luminomeetriliselt ning valgu olemasolu on märgatav juba vähem kui pikogrammi juures 24 tundi peale transfektsiooni (Yang jt, 1997).

1.4.3 pLIVE plasmiid

pLIVE (*Liver In Vivo Expression*) plasmiid (Mirus) on 3423 aluspaari suurune ning SEAP geeni sisestamisel on vektori suurus 4992 aluspaari. Plasmiidis on kimäärne promootor, mis on kombineeritud hiire albumiini ja alfa fetoproteiini enhanser II

promootoritest. Plasmidi sisestatud geeni ekspressiooni suurendamiseks on vektorisse sisestatud kaks intronit. Esimese introni järel on multikloneerimissait kaheksa erineva restriksiooni alaga. Plasmiid on maksaspetsiifiline ja selle tagab kombineeritud promootor ja sisestatud intronid.

(https://www.mirusbio.com/assets/protocols/ml047_plive_in_vivo_expression_and_reporter_vectors.pdf)



Joonis 2. pLIVE-SEAP vektor. Vektoris sisaldub hire albumiini promootor, AFP enhanser ja intronid tagavad maksaspetsiifilise geeniekspressiooni. Geeniks on SEAP.

(https://www.mirusbio.com/assets/protocols/ml047_plive_in_vivo_expression_and_reporter_vectors.pdf)

2. Eksperimentaalne osa

Kõik meetodid (peale peptiidisünteesi, siRNA ja geeniekspressiooni vektorite disaini ning protseduurid katseloomadega) viis läbi ja analüüsis tulemused töö autor.

2.1 Töö eesmärgid

Töö eesmärkideks on:

- Hiire maksas ekspresseeritava reportergeeni mudeli väljatöötamine ja optimeerimine
- Teha kindlaks SEAP geeni ekspresseerumine maksarakkudes
- Valideerida mudel geeniekspressiooni vagistamise uurimiseks hiire maksas
- Vaigistada geeni ekspressiooni maksas kasutades siRNA/PF14 komplekse
- Vaigistada geeni ekspressiooni maksas kasutades shRNA-d kodeerivat pDNA ja PF14 komplekse

2.2 Materjalid ja metoodika

2.2.1 Kasutatud rakuliinid

Hep3B (hepatotsellulaarse kartsinoomi) rakke kasvatati Iscove Modifitseeritud Dulbecco söötmes (IMDM), kuhu oli lisatud 10% veise looteserumit (FBS), 0,1 mmol/l asendatavaid aminohappeid ning 100 U/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomütsiini. Rakke kasvatati 37 °C juures ja 5% CO₂ sisaldusega. Rakke külvati ümber 2-3 päeva järel.

U87 (glioblastoomi rakud) rakke kasvatati želatiinil DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) söötmes, kuhu oli lisatud 10% veise looteserumit (FBS), 0,1 mmol/l asendatavaid aminohappeid ning 100 U/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomütsiini. Rakke kasvatati 37 °C juures želatiini kihil ja 5% CO₂ sisaldusega. Rakke külvati ümber 2-3 päeva järel.

2.2.2 Kasutatud peptiid

Eksperimentides kasutatud peptiid sünteesiti molekulaarse biotehnoloogia labori poolt. Kasutati Fmoc tahke faasi peptidisünteesi. Stearüülhape kinnitati N-terminaalsesse otsa kasutades TBTU/HOBt aktiveerimist diklorometaanis/dimetüülformaamiidis. Segus, mis sisaldas 95% TFA-d, 2,5% vett ja 2,5% triisopropüülsilaani lõigati peptiidi ja sadestati dietüüleetris. Peptiidi kuivatati vaakumis üleöö ning puhastati vedelikkromatograafia. Produkti kontrolliti massispektromeetriga.

2.2.3 Komplekside moodustamine

Rakkudes reportergeeni tasemete indutseerimiseks kasutati pLIVE plasmidi transporti PF14 vahendusel. Selleks moodustati peptiid/plasmid partiklid mittekovaalentselt. Partiklid moodustati erinevate laengu suhete (*charge ratio*, CR; CR2 ja CR4), mis saadi lisades samale kogusele plasmidile (0,5µg) erinev kogus peptiidi. Partiklite CRid saadi teoreetilise arvutuse käigus, arvestades peptiidi positiivseid laenguid ning pDNA negatiivseid laneguid. Kompleksid moodustati ruumalas 105µl, kuhu lisati 2,1µl pDNAd (0,01µg/µl) ning näiteks CR2 juures lisati peptiidi lõpp-kontsentratsiooniga 12,2 µM. Komplekse inkubeeriti 45 minutit enne transfekkeerimist toatemperatuuril.

Transfektsiooni positiivseks kontrolliks kasutati Lipofectamine 2000 (Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent, Invitrogen, Rootsi). Kompleks segati kokku kahes osas: esmalt segati kokku 105 µl OptiMEM (Opti-MEM® I Reduced-Serum Medium 1x, Invitrogen, Rootsi) ja 2,6 µl LF2000 (1mg/ml). Eraldi segati kokku 2,1 µl plasmidi (0,5 µg/µl) ning 105µl OptiMEMi. Peale 15 minutit inkubeerimist segati segud kokku. Ühele kaevule lisati 100 µl komplekse, kus oli 0,5 µg pDNAd.

Geeni vaigistamiseks moodustati siSEAP/peptiidi kompleksid. Selleks tehti 100 nM siRNA (tabel2) kontsentratsiooniga kompleksid erinevatel siRNA/peptiid molaarsuhtel 1:20, 1:30 ja 1:40. Komplekside lõppruumalaks oli 100 µl. Enne transfektsiooni inkubeeriti komplekse 45 minutit. Negatiivseks kontrolliks kasutati ebarelevantse geeni vastu suunatud siRNA: Luc2-siRNA (tabel2) molaarsuhtel 1:30.

Tabel 2. SEAP- ja Luc2-siRNA järjestused.

SEAP-siRNA	<i>Sense</i>	5'-AGG GCA ACU UCC AGA CCA Utt*-3'
	<i>Antisense</i>	5'-AUG GUC UGG AAG UUG CCC Utt-3'
Luc2-siRNA	<i>Sense</i>	5'-GGA CGA GGA CGA GCU CUU Ctt-3'
	<i>Antisense</i>	5'-GAA GUG CUC GUC CUC GUC Ctt-3'

* t – DNA nukleotiid

2.2.4 pDNA/peptiid kompleksidega transfektsioon rakukultuuris

Rakud külvati 24-kaevulisele plaadile 50 000 raku kaevu kohta. Rakkudel lasti kasvada 24 tundi. Transfektsioonile eelnevalt asendati rakkudel vana sööde uuega (450 µl). Seejärel transfekteerimiseks lisati 50 µl komplekse (CR2 ja CR4) või ekvivalentses koguses puhast pDNA ühe kaevu kohta. LF2000 puhul lisati söödet 400 µl ja kompleksi 100 µl. 4 tundi peale transfektsiooni lisati rakkudele 1 ml söödet ning inkubeeriti transfekteeritud rakke 24 tundi.

2.2.5 SEAP ekspressiooni mõõtmine

Kuna SEAP on sekreteeritav valk, saab selle aktiivsust mõõta raku söötmetest. Selleks, et mõõta SEAPi ekspressiooni võeti rakkudel 50 µl söödet erinevatel ajapunktidel, 4, 24 ja 48 tundi peale transfektsiooni. Seejärel rakud lüüsi, kasutades 0,2% Triton-X-100 lahust 1X analüüsipuhvris (Sensolyte® Luminescent Secreted Alkaline Phosphatase Reporter Gene Assay Kit, Anaspec). Lüüs toimus 4 °C juures 10 minutit.

SEAP valgu spetsiifiliseks määramiseks on vajalik kuumutustsükkel (30 minutit 65 °C, 5 minutit 4 °C ja 5 minutit 25 °C). Kasutatud SEAP aktiivsuse mõõtmise reagent (Sensolyte® Luminescent Secreted Alkaline Phosphatase Reporter Gene Assay Kit, Anaspec) konverteerib SEAP ensüümi aktiivsuse bioluminestsents-signaaliks, mida saab lihtsalt mõõta luminomeetriga. SEAPi aktiivsust mõõdeti kasutades valgeid 96-kaevulisi plaate (Optiplate 96, PerkinElmer) ning luminomeetrit (GLOMAX). Selleks kanti kaevu 50 µl proovi, sellele lisati 50 µl fosfataasi substraati, milleks on CSPD, mis fosfaatrühma eemaldamise järel muutub ebastabiilseks dioekstaani aniooniks ning laguneb ning kiirgab

valgust. Segu inkubeeriti 20 minutit vastavalt tootja protokollile ning mõõdeti seejärel luminomeetriga. Proovide SEAP aktiivsus normaliseeriti proovi valgusisalduse suhtes, kasutades Lowry meetodil põhinevat valgu mõõtmise reagenti (Bio-Rad DC). Tulemused on väljendatud suhtelise valgusühikuna mg valgu (RLU/mg) kohta. Katseid korraldati kolm korda ning igas katses oli kolm tehnilist replikaati.

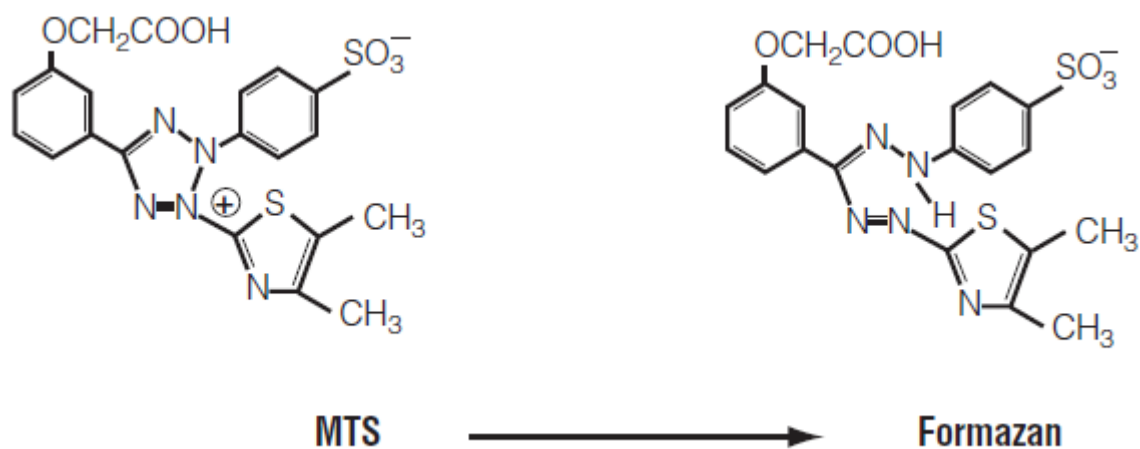
2.2.6 siRNA/peptiidi kompleksidega topelttransfektsioon

Hep3B rakud külvati 24-kaevulisele plaadile, 50 000 rakku kaevu kohta. Rakkudel lasti kasvada 24 tundi enne transfekkeerimist. Rakkudel vahetati sööde enne transfektsiooni 450 µl täissöötmega. Transfekkeeriti CR2 juures pSEAP/PF14 kompleksidega. Komplekse inkubeeriti 45 minutit ning lisati 50 µl kaevu kohta. 4 tunni möödudes lisati 1 ml söödett rakkudele.

24 tunni möödudes transfekkeeriti rakke siSEAP/PF14 kompleksidega. Selleks vahetati rakkudel sööde ning lisati 50 µl siRNA/peptiidi kompleksi. Proovid võeti raku söötkest enne transfektsiooni ning 24 ja 48 tundi pärast siRNA transfektsiooni, samuti võeti proovid lüüsitud rakkudest. SEAPi sisaldust mõõdeti samamoodi nagu kirjeldatud punktis 2.2.5. Katseid korraldati kolm korda.

2.2.7 Rakkude elulemuse hindamine

Rakkude elulemuse hindamiseks kasutati MTS *proliferation* analüüsi (CellTiter 96[®] AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega, Rootsi), mis on kolorimeetriline meetod elusate rakkude hindamiseks. Rakusöötmesse lisatakse reagenti, mis rakkude ainevahetuse käigus muudetakse ühendiks, mille neelduvust on võimalik mõõta kolorimeetriliselt.



Joonis 3. MTS-i ja formasaani struktuurid

Selleks, et mõõta rakkude elulemust külvati 96-kaevulisele plaadile Hep3B rakud (10^4 rakku kaevu kohta). 24 tunni möödudes transfecteeriti rakud kasutades pSEAP/PF14 (CR2) komplekse, pSEAP/LF2000 komplekse ning peale topelttransfectiooni siSEAP/PF14 (MR 1:20, 1:30, 1:40) kompleksidega. 100% elulemust vastab töötlemata rakkude elulemusele.

2.2.8 Reportergeeni ekspresseerimine maksas

Kõik hiirtega läbiviidud protseduurid ning eksperimendid on kinnitatud Eesti Eetikakomitee loaga (luba nr. 69 ja 70, 9 veebruar 2011) ning läbi viidud katseloomadega tööloa omavate töötajate poolt.

Katsetes kasutati emaseid ning isaseid balb/c hiiri. Esmalt indutseeriti hiirtes SEAPi ekspressioon. Selleks manustati 3 ml hüdrodünaamilise süsti lahust (TransIT Delivery Solution, Mirus), millesse oli lisatud 10µg pSEAPi kodeerivat plasmidi, hüdrodünaamiliselt hiire sabaveeni. Reportergeeni ekspressiooni teket valideeriti ja ekspressiooni kulgu jälgiti vastavalt eelnevalt nimetatud meetodile punktis 2.2.5.

Peale stabiilse reportergeeni ekspressiooni saavutamist kasutati geenivaigistamiseks kahte meetodit. Esimese meetodi korral süstiti hiiri PF14/siSEAP MR30 kompleksidega. Katses kasutati 22 hiirt, kes jaotati nelja rühma – viiele hiirele süstiti komplekse 1 mg/kg ja viiele hiirele manustatud doos oli 0,5 mg/kg. Viit looma süstiti siSEAP-ga (1mg/kg), mis ei olnud kompleksis peptiidiga ning seitsmele loomale siSEAPi ei manustatud. Komplekse inkubeeriti tund aega, enne süstimist ja manustati koos 5% glükoosiga sabaveeni kaudu.

Teiseks meetodiks oli PF14 ja p-shSEAP (Invivogen, USA) kompleksid kasutamine. Selleks segati kompleksid nagu punktis 2.2.3 CR4 juures, kasutades 20µg p-shSEAP (1mg/ml) PF14ga. Puhas p-shSEAP (20µg) 100 µl MQ vees oli kontrolliks. Komplekse inkubeeriti 1 tund toatemperatuuril ning vahetult enne süstimist lisati glükoosi (5%). Katses kasutati 14 hiirt (9 isast ja 5 emast), kes jaotati kolme rühma – viiele loomale süstiti plasmidi, neljale loomale süstiti peptiidi/plasmidi komplekse ja viis hiirt jäeti SEAP ekspressiooni kontrolliks ning neid ei süstitud. Kuu aega peale esimest süstimist manustati hiirtele uuesti peptiid/pDNA komplekse sama protokoll järgi nagu eelnevalt kirjeldatud.

2.2.9 Vereproovide kogumine ning SEAPi aktiivsuse mõõtmine

Hiirtelt koguti verd reieveenist. Selleks kasutati hepariniseeritud klaas-kapillaare (Marienfeld, Saksamaa) mille abil kanti veri hepariniseeritud tuubidesse (Microvette 200 LH, SARSDT). Vereseerumi eraldamiseks tsentrifuugiti verd 1000g juures 10 minutit. 5 µl

proovist mõõdeti SEAP aktiivsust nagu kirjeldatud punktis 2.2.5. Proove koguti 1, 3, 7, 9, 14 ja 23ndal päeval peale süstimist.

Kõik andmed on esitatud keskmine \pm SEM.

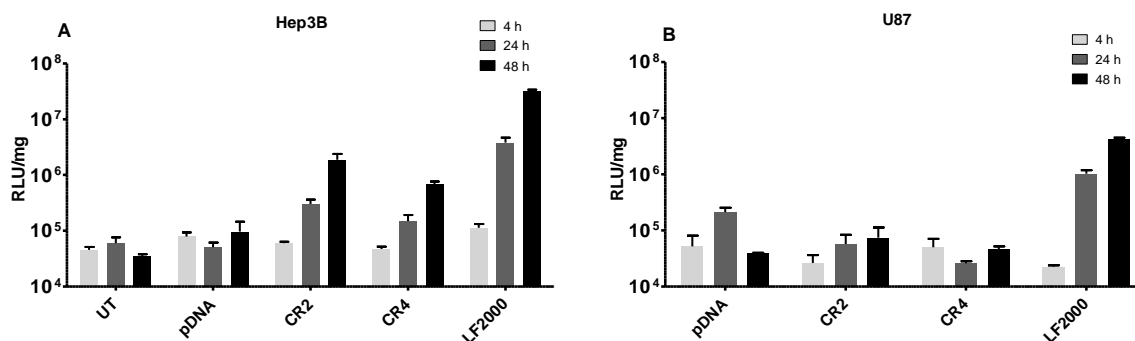
2.3 Tulemused

2.3.1 Transfektsiooni efektiivsus erinevates rakuliinides pSEAP/PF14 partiklitega

pSEAP/PF14 partiklitega transfecteeriti Hep3B rakke ja U87 rakke. Moodustunud partiklid sisaldavad maksaspetsiifilise ekspressiooniga pLIVE vektoris asuvat SEAP reportergeeni ning seetõttu on transfektsioon efektiivsem Hep3B rakkudes (joonis 1A). PF14 vahendatud transpordil transfecteerib rakku kõige efektiivsemalt kompleks CR2 juures, edasine peptiidi koguse suurendamine transfektsiooni määra ei tõstnud.

4 tundi pärast transfektsiooni ei erine geeniekspressioon erinevalt töödeldud Hep3B rakkudel pDNAga töödeldud rakkudest, kuid 24 tundi peale transfektsiooni on geeniekspressioon märgatavalt suurenenud rakkudes, mida on töödeldud kompleksidega, mis sisaldavad peptiidi või LF2000. 48 tunni möödudes on PF14/pDNA komplekside vahendatud geeniekspressioon suurenenud Hep3B rakkudes üle kümne korra ning LF2000 puhul üle saja korra.

U87 rakkude puhul on samuti LF2000-ga transfecteeritud rakkudes SEAPi ekspressioon suurim, kuid 10 korda vähem, kui Hep3B rakkudes.. U87 rakkudes jäi transfektsioon PF14ne vahendusel samale tasemele kui vaid pDNAga töödeldud rakud, mis tähendab, et SEAP ekspressiooni ei indutseeritud rakkudes.



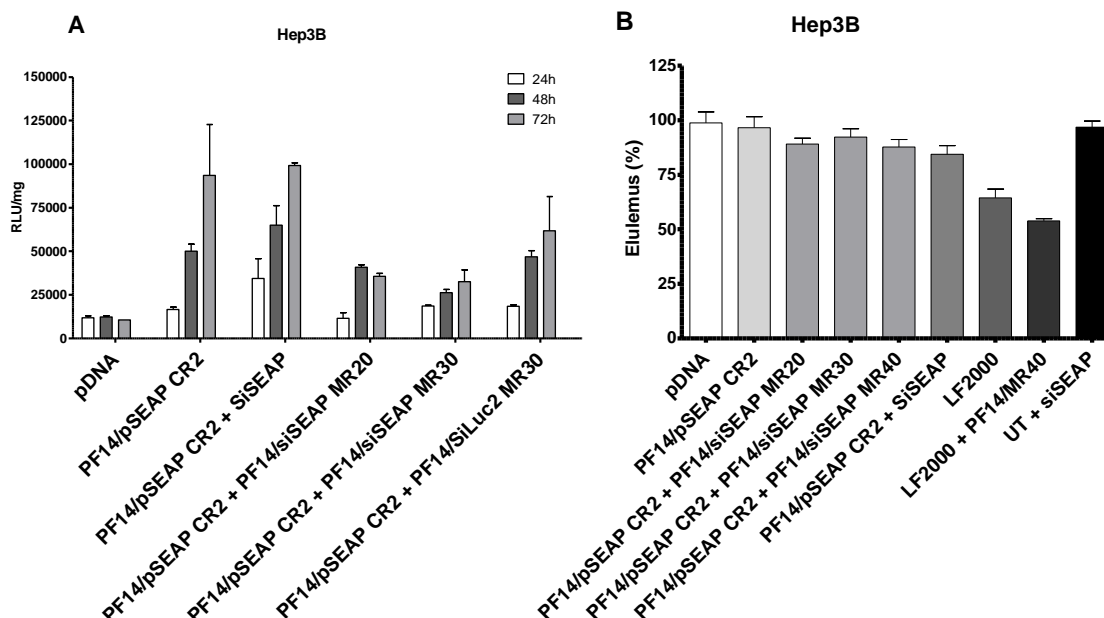
Joonis 4. SEAP aktiivsused pärast transfektsiooni PF14/pSEAP kompleksidega A. Hep3B ja B. U87 rakuliinides 4, 24 ja 48 tundi peale transfektsiooni

2.3.2 Topelttransfektsiooni efektiivsus PF14/pSEAP partikleid kasutades

Peale SEAP valgu ekspressiooni indutseerimist PF14/pSEAP CR2 kompleksidega Hep3B rakkudes, prooviti ekspressiooni vaigistada 24 tundi peale ekspressiooni saavutamist kasutades PF14/siSEAP partikleid. Võrdluseks võeti rakud, kus SEAP ekspressiooni ei vaigistatud, samuti töötlemata rakud ning rakud, mis said ekvivalentse koguse puhast pDNAd.

Geeni mahareguleerimist on näha alates 24-st tunnist peale siRNA kompleksidega transfekteerimist (joonis 5). Geeni ekspressiooni muutused on SEAPi spetsiifilised, sest rakkudes, mida töödeldi Luc2 siRNaga on valgu taseme muutus oluliselt väiksem.

Rakkude elumust hinnati 24 tundi peale topelttransfektsiooni. Rakkudes, mida transfekteeriti vaid PF14/pSEAP kompleksidega, on elulemus sarnane töötlemata rakkudega, üle 95%. Partiklid, kus siRNA ei olnud seotud peptiidiga, jäi rakkude elulemus samuti töötlemata rakkudega samale tasemele. LF2000, mille transfektsioon oli küll efektiivsem kui PF14-1, on rakkudele toksiline, peaaegu 40% rakke on surnud vaid SEAPi indutseerimisel ning topelttransfektsioonil LF2000/siRNA partiklitega on surnud rakke peaaegu 50%. Seetõttu ei saa kasutada LF2000 geeniekspressiooni tasemete muutmiseks korduval kasutamisel, sest rakkude elumus on liialt mõjutatud.

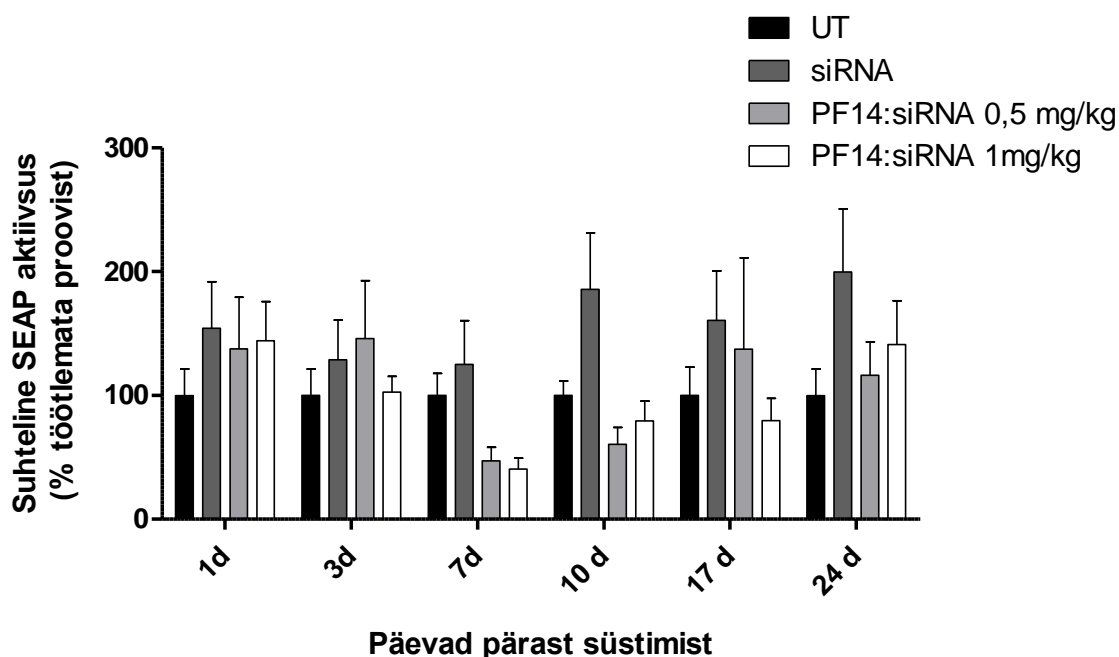


Joonis 5. A - Hep3B rakkudel on indutseeritud SEAP ekspressioon (24 h) ning seejärel on vaigistatud PF14/siSEAP partiklitega erinevatel molaarsuhetel. Saadud SEAP väärtused oon

normaliseeritud valgu vastu ja esitatud RLU/mg kohta. B – Topelttransfekteeritud rakkude elumus, normaliseeritud töötlemata rakkude vastu

2.3.3 Reportergeeni mahasurumine hiire maksas

Hiirtele, kellel oli varasemalt SEAP ekspressioon indutseeritud, tekkis SEAP ekspressioon umbkaudu nädalaga. Hiirtele süstiti erinevate doosidega (0,5 mg/kg ja 1 mg/kg) siSEAP komplekse, et hinnata komplekside efektiivsust geeni vaigistamisel. Kontrolliks süstiti hiiri ka puhta siSEAPga, et kontrollida peptiidi vajalikkust geeni vaigistamisel. siSEAP/PF14 komplekse saanud hiirte puhul oli näha geenivaigistamist, mis jõudis maksimumini 7 päeva pärast süstimist (joonis 6). Seejärel hakkas valgu tase uuesti tõusma, mis tuleneb RNAi mööduvast efektist. Suurema doosi saanud hiirtel oli geeni ekspressioon vähenenud kuni 60% ja väiksema doosi saanud hiirtel kuni 55%. Kolme nädala möödudes süstist on SEAP aktiivsuse tase taastunud esialgsele tasemele. Geeniekspressioon puhta siRNA süstimisel ei vähenenud vaid kohati isegi suurenes.



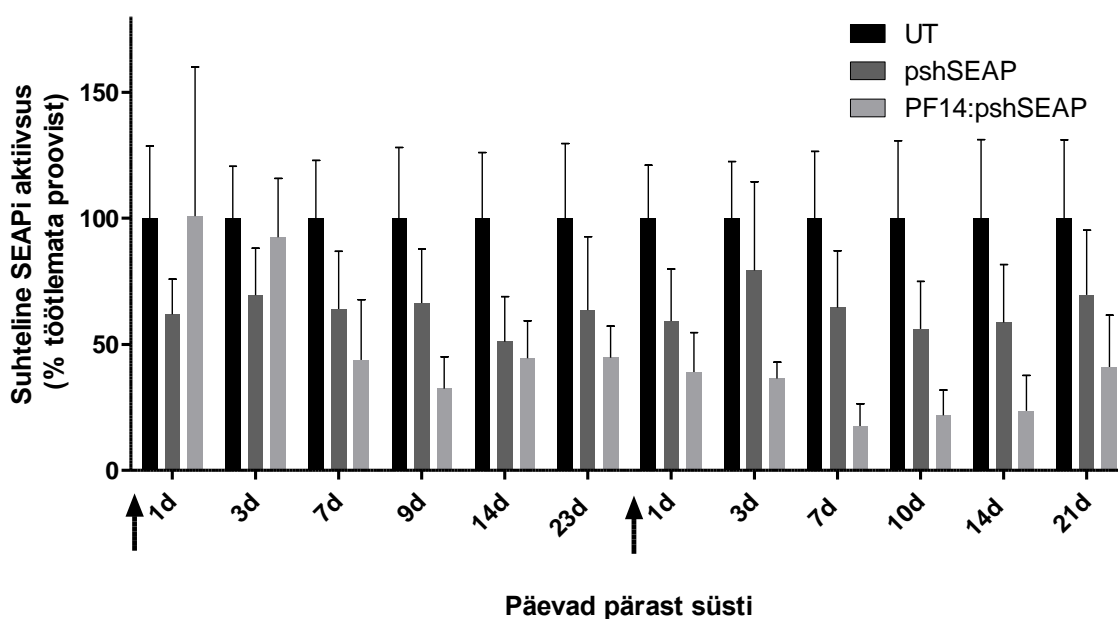
Joonis 6. Hiirte vereseerumist mõõdetud SEAPi tase pärast siSEAP komplekside manustamist, proovid on võetud erinevatel ajapunktidel. Tulemused on normaliseeritud süstimata hiirtelt saadud väärtuste vastu.

2.3.4 Geeni SEAP mahasurumine pshSEAP ga hiire maksas

Hiirtele, kellel oli varem indutseeritud SEAP ekspressioon, süstiti plasmiid, mis kodeerib shSEAP, et sealt kodeeritav shRNA vaigistaks SEAP geeniekspressiooni maksas. Kuna DNA on stabiilsem kui RNA, siis püsis plasmiid organismis kauem ning vaigistamise efekt oli pikem kui siRNA kompleksidega töötlemise puhul.

SEAP tasemeid mõõtes oli näha, et nädala möödudes on kompleksidega süstitud hiirtes SEAPi aktiivsus vähenenud 60% jõudes miinimumini 9. päeval, kui geeni ekspressioon on ainult 32% (joonis 7). Kahe nädala möödudes on pDNA vaigistus jõudnud maksimumini, ekspressioon on ligikaudu 51% võrreldes hiirtega, kellel ei ole geeni vaigistatud.

Kuu aega peale esimest süstimist, süstiti hiiri veelkord samadel tingimustel. Teise süsti tulemusel saavutati veel suurem geeni vaigistamine, kuid maksimaalne vaigistamine saabus jälle nädal peale süstimist, geeniekspressioon oli vaigistatud üle 80%. pDNAGA süstitud hiirte puhul jäi ekspressioon ühtlaselt 50% kuni 60% vahele ning ei langenud rohkem.



Joonis 7. Vereseerumist mõõdetud SEAPi tasemes, puhta pshSEAPi või pshSEAP/PF14 komplekside manustamised on tähistatud nooltega. Tulemused on normaliseeritud töötlemata hiirte vereseerumist saadud väärtuste vastu.

2.4 Arutelu

Geeniteraapia on potentsiaalne meetod tulevikus mitmete haiguste raviks. Praegu on takistavaks teguriks efektiivse ja ohutu transportvektori puudumine. Viirusvektorid on võimelised transportima geneetilist materjali, kuid võivad põhjustada tugevat immunreaktsiooni ning olla kantserogeense toimega (Bryant jt., 2013). Mitteviiruslikud vektorid on organismile ohutumad, kuid geneetilise materjali toimetamine rakku ei ole piisavalt efektiivne.

RSPd pakuvad võimalust nukleiinhapete toimetamiseks rakkudesse ning on kasutatavad nii *in vitro* kui *in vivo* tingimustes. Antud töös kasutati RSPd PF14, mis on võimeline moodustama nanokomplekse nii siRNA kui ka pDNAGA ning võimeline antud komplekse transportima erinevatesse rakuliinidesse (Ezzat jt., 2012; Veiman jt., 2013). Lisaks on PF14 võimeline transportima pDNAd erinevatesse organitesse, seal hulgas maksa ja indutseerima seal geeniekspressiooni tasemeid (Veiman jt., 2015). Sellest lähtuvalt otsustati uurida tema geeni vaigistamise potentsiaali maksas.

Selleks, et hinnata maksas RNAi-l põhinevat geenivaigistamist on mitmeid erinevaid meetodeid. Üheks võimaluseks oleks kasutada qPCRi, mis võimaldab vaigistatud geeni tasemeid mõõta mRNA tasemel, sealjuures tuleks valideerida ka geenivaigistamine valgu tasandil, kasutades selleks sobivat meetodit, näiteks western bloti. Selline meetodite kombinatsioon nõuab eelnevalt põhjalikku valideerimist ja optimeerimist.

Teine võimalus on kasutada reportersüsteemi mis võimaldab kiiresti ja piisava tundlikkusega määrata geenivaigistamist. Me ei valinud Luc reporterit, sest geeni vaigistamise ajalise dünaamika määramiseks puudus eluslooma kuvamisseade. Miruse SEAP vektorist ekspresseeritud valgu tasemeid on võimalik vereproovist määrata, puudub vajadus spetsiaalsete seadmete järele ja seega otsustasime mudeli ehitada sellele reporterile. SEAPi eelis reportergeenina kasutamisel on lisaks see, et ekspresseeritud valku on lihtne mõõta, kerge eristada teistest valkudest ning ta on mõõdetav ka vähese koguse juures (Cullen, 2000). Kasutades maksaspetsiifilist plasmidi pLIVE oli geeniekspressioon 10 korda kõrgem kui glioma rakuliinis (joonis 4), sest plasmiidil olev promootor on võimeline avalduma eelkõige maksarakkudes.

Hiires maksas indutseeriti SEAPi ekspressioon kasutades hüdrodünaamilist süsti. Kui püsiv SEAP ekspressioon oli saavutatud, alustati siSEAP/PF14 või pshSEAP/PF14 komplekside manustamist, mis vaigistasid SEAP geeni ning alandasid valgu ekspressiooni. SEAP tasemeid jälgiti vereproovidest

shRNA on võimalik sisestada pDNA vektorisse, mille teoreetiliseks eeliseks on see, et pDNA siseneb raku tuuma ja jääb sinna episoomina. Sealt saab geen pidevalt ekspresseeruda ning ei kao rakujagunemise käigus rakust ära. Seetõttu võib eeldada, et shSEAP vahendatud geenivaigistamine on püsivam kui siRNA oma, mis jääb vaid raku tsütoplasmasse ning kaob rakust aja jooksul. Lisaks pDNA rakku viimisele suudab PF14 moodustada kompleksi ka siRNaga ning moodustunud kompleks suudab siseneda rakku ning seal bioloogilist efekti vahendada. Hep3B rakkudes, kus oli SEAP ekspressioon, suutis siSEAP/PF14 kompleks vaigistada SEAP geeni ekspressiooni, viies ekspressiooni kaks korda madalamale tasemele kui rakkudes, kus ekspressiooni ei vaigistatud (Joonis 5a).

Sama transfektsioon viidi läbi ka *in vivo* tingimustes, kus SEAP ekspressioon oli indutseeritud hüdrodünaamilise süstiga. Geenivaigistamist nähti nii siRNA kui shRNA kompleksidega. siSEAP/PF14 kompleksidega saavutati maksimaalne vaigistamine 7 päeva peale süstimist ning geeni ekspressioon langes kuni 60% (joonis 6). pshSEAP plasmidi süstimisel oli geenivaigistus kuni 80% ning kestis kuni kaks nädalat (joonis 7). Nagu ilmnes katsetes, kestis pshSEAP kompleksidega geenivaigistus kauem kui siSEAP kompleksidega. Üheks võimaluseks võib olla asjaolu, et shSEAPi toodeti pidevalt juurde, kuni plasmiid rakkudes püsis. Kompleksiga sisse viidud siSEAP enam juurde ei toodetud ning tõenäoliselt on seetõttu vaigistamisperiood lühem.

Geenivaigistamine kasutades PF14 on efektiivne ning tekkivad kompleksid on *in vivo* tingimustes kasutamiseks sobivad. Rakkudele tehtud elulemuse katse tõestas, et PF14 on rakkudele ohutu transportvektor. Antud töös välja töötatud reportersüsteem tõestab, et PF14 vahendatud nukleinhapete transporti maksa võib edaspidi rakendada ka kliiniliselt olulise haigusmudeli puhul.

Kokkuvõte

Geeniteraapia suurimaks väljakutseks on leida efektiivne ning ohutu transportvektor nukleiinhapete viimiseks rakkudesse. Üheks potentsiaalseks kandidaadiks võivad olla rakku sisenevad peptiidid (RSP).

Antud töös kasutati RSPd PepFect14, mis on võimeline moodustama komplekse plasmiidse DNAGA ja lühikese interfereeruva RNAGA. Eesmärk oli luua mudel geeni vaigistamiseks maksas ning selle põhjal hinnata PF14 potentsiaali nukleiinhapete, siRNA ja pshRNA transportimiseks geenivaigistamise eesmärgiga. Selleks loodi esmalt *in vitro* mudel kasutades Hep3B rakke. Rakkudes indutseeriti reportergeeni ekspressioon kasutades maksaspetsiifilist plasmidi, ning seejärel vaigistati valgu ekspressioon RNAi vahendusel kasutades siSEAP/PF14 ja pshSEAP/PF14 komplekse.

Oma töös olen välja selgitanud efektiivse meetodi reportergeeni mahasurumiseks hiire maksas ning seda mudelit saab potentsiaalselt edaspidi kasutada maksaga seotud haiguste ravis.

PepFect14 mediated nucleic acid delivery into liver cells for gene silencing

Elin Madli Peets

Summary

Gene therapy has great potential for curing many diseases however there is still difficulty in transporting nucleic acids which have high molecular weight and negative net charge. For nucleic acids to have any biological effect, transport vectors are needed. One possible way is to use cell penetrating peptides (CPPs). CPPs are able to condense nucleic acids and transport them into cells. In this work, PepFect14 (PF14) was used to transport plasmid DNA and siRNA into liver cells. Using SEAP reportergene, a mouse model was created to study gene silencing using siRNAs and shRNAs. The results showed that both methods were effective, shRNA lasting longer. This indicates the potential to use such strategy for clinically relevant disease models.

Tänuõnad

Täna väga enda juhendajaid, Kaido Kurrikoffi ning Kadi-Liis Veimanit nõuannete ja juhendamise eest. Samuti täna professor Ülo Langelit ning meeldivat kollektiivi molekulaarse biotehnoloogia laborist.

Kasutatud kirjandus

Bechara, C., and Sagan, S. (2013). Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Lett.* 587, 1693–1702.

Berger, J., Hauber, J., Hauber, R., Geiger, R., and Cullen, B.R. (1988). Secreted placental alkaline phosphatase: a powerful new quantitative indicator of gene expression in eukaryotic cells. *Gene* 66, 1–10.

Borensztajn, K., and Spek, C.A. (2005). Inherited Coagulation Factor VII and X Deficiencies Associated with Severe Bleeding Diathesis: Molecular Genetics and Pathophysiology. *Current Genomics* 6, 383–400.

Bryant, L.M., Christopher, D.M., Giles, A.R., Hinderer, C., Rodriguez, J.L., Smith, J.B., Traxler, E.A., Tycko, J., Wojno, A.P., and Wilson, J.M. (2013). Lessons learned from the clinical development and market authorization of Glybera. *Hum Gene Ther Clin Dev* 24, 55–64.

Carthew, R.W., and Sontheimer, E.J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136, 642–655.

Crespo, A., Peydró, A., Dasí, F., Benet, M., Calvete, J.J., Revert, F., and Aliño, S.F. (2005). Hydrodynamic liver gene transfer mechanism involves transient sinusoidal blood stasis and massive hepatocyte endocytic vesicles. *Gene Ther* 12, 927–935.

Cullen, B.R. (2000). Utility of the secreted placental alkaline phosphatase reporter enzyme. *Meth. Enzymol.* 326, 159–164.

Deng, Y., Wang, C.C., Choy, K.W., Du, Q., Chen, J., Wang, Q., Li, L., Chung, T.K.H., and Tang, T. (2014). Therapeutic potentials of gene silencing by RNA interference: principles, challenges, and new strategies. *Gene* 538, 217–227.

Domvri, K., Zarogoulidis, P., Porpodis, K., Koffa, M., Lambropoulou, M., Kakolyris, S., Kolios, G., Zarogoulidis, K., and Chatzaki, E. (2012). Gene therapy in liver diseases: state-of-

the-art and future perspectives. *Curr Gene Ther* 12, 463–483.

Dubé, I.D., and Cournoyer, D. (1995). Gene therapy: here to stay. *CMAJ* 152, 1605–1613.

Ezzat, K., Zaghloul, E.M., El Andaloussi, S., Lehto, T., El-Sayed, R., Magdy, T., Smith, C.I.E., and Langel, U. (2012). Solid formulation of cell-penetrating peptide nanocomplexes with siRNA and their stability in simulated gastric conditions. *J Control Release* 162, 1–8.

Ezzat, K., EL Andaloussi, S., Zaghloul, E.M., Lehto, T., Lindberg, S., Moreno, P.M.D., Viola, J.R., Magdy, T., Abdo, R., Guterstam, P., et al. (2011). PepFect 14, a novel cell-penetrating peptide for oligonucleotide delivery in solution and as solid formulation. *Nucleic Acids Res* 39, 5284–5298.

Gao, H., and Hui, K.M. (2001). Synthesis of a novel series of cationic lipids that can act as efficient gene delivery vehicles through systematic heterocyclic substitution of cholesterol derivatives. *Gene Ther.* 8, 855–863.

Gao, X., Kim, K.-S., and Liu, D. (2007). Nonviral gene delivery: What we know and what is next. *AAPS J* 9, E92–E104.

Grijalva, J., and Vakili, K. (2013). Neonatal liver physiology. *Seminars in Pediatric Surgery* 22, 185–189.

Guo, P., Coban, O., Snead, N.M., Trebley, J., Hoeprich, S., Guo, S., and Shu, Y. (2010). Engineering RNA for Targeted siRNA Delivery and Medical Application. *Advanced Drug Delivery Reviews* 62, 650–666.

Han, S., Mahato, R.I., Sung, Y.K., and Kim, S.W. (2000). Development of Biomaterials for Gene Therapy. *Mol Ther* 2, 302–317.

Hiramatsu, N., Kasai, A., Hayakawa, K., Yao, J., and Kitamura, M. (2006). Real-time detection and continuous monitoring of ER stress in vitro and in vivo by ES-TRAP: evidence for systemic, transient ER stress during endotoxemia. *Nucl. Acids Res.* 34, e93–e93.

Ibraheem, D., Elaissari, A., and Fessi, H. (2014). Gene therapy and DNA delivery systems. *Int J Pharm* 459, 70–83.

Jacobs, F., Gordts, S.C., Muthuramu, I., and De Geest, B. (2012). The Liver as a Target Organ for Gene Therapy: State of the Art, Challenges, and Future Perspectives. *Pharmaceuticals* 5, 1372–1392.

Jackson, A.L., Burchard, J., Leake, D., Reynolds, A., Schelter, J., Guo, J., Johnson, J.M., Lim, L., Karpilow, J., Nichols, K., et al. (2006). Position-specific chemical modification of siRNAs reduces “off-target” transcript silencing. *RNA* 12, 1197–1205.

Judge, A.D., Bola, G., Lee, A.C.H., and MacLachlan, I. (2006). Design of Noninflammatory Synthetic siRNA Mediating Potent Gene Silencing in Vivo. *Mol Ther* 13, 494–505.

Kaestner, L., Scholz, A., and Lipp, P. (2015). Conceptual and technical aspects of transfection and gene delivery. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25, 1171–1176.

Kaufmann, K.B., Büning, H., Galy, A., Schambach, A., and Grez, M. (2013). Gene therapy on the move. *EMBO Mol Med* 5, 1642–1661.

Kilk, K., El-Andaloussi, S., Järver, P., Meikas, A., Valkna, A., Bartfai, T., Kogerman, P., Metsis, M., and Langel, U. (2005). Evaluation of transportan 10 in PEI mediated plasmid delivery assay. *J Control Release* 103, 511–523.

Kim, T.K., and Eberwine, J.H. (2010). Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem* 397, 3173–3178.

Leader, B., Baca, Q.J., and Golan, D.E. (2008). Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nat Rev Drug Discov* 7, 21–39.

Ledley, F.D., and Shapiro Ledley, T. (1998). Pharmacokinetic considerations in somatic gene therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 30, 133–150.

Lehto, T., Simonson, O.E., Mäger, I., Ezzat, K., Sork, H., Copolovici, D.-M., Viola, J.R.,

Zaghloul, E.M., Lundin, P., Moreno, P.M.D., et al. (2011). A peptide-based vector for efficient gene transfer in vitro and in vivo. *Mol. Ther.* 19, 1457–1467.

Lundin, P., Johansson, H., Guterstam, P., Holm, T., Hansen, M., Langel, Ü., and EL Andaloussi, S. (2008). Distinct Uptake Routes of Cell-Penetrating Peptide Conjugates. *Bioconjugate Chemistry* 19, 2535–2542.

McAnuff, M.A., Rettig, G.R., and Rice, K.G. (2007). Potency of siRNA versus shRNA mediated knockdown in vivo. *J. Pharm. Sci.* 96, 2922–2930.

McIntyre, G.J., and Fanning, G.C. (2006). Design and cloning strategies for constructing shRNA expression vectors. *BMC Biotechnol* 6, 1.

Miska, W., and Geiger, R. (1987). Synthesis and characterization of luciferin derivatives for use in bioluminescence enhanced enzyme immunoassays. New ultrasensitive detection systems for enzyme immunoassays, I. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 25, 23–30.

Mäe, M., and Langel, U. (2006). Cell-penetrating peptides as vectors for peptide, protein and oligonucleotide delivery. *Curr Opin Pharmacol* 6, 509–514.

Pooga, M., Hällbrink, M., Zorko, M., and Langel, U. (1998a). Cell penetration by transportan. *FASEB J.* 12, 67–77.

Pooga, M., Soomets, U., Hällbrink, M., Valkna, A., Saar, K., Rezaei, K., Kahl, U., Hao, J.X., Xu, X.J., Wiesenfeld-Hallin, Z., et al. (1998). Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo. *Nat. Biotechnol.* 16, 857–861.

Ramsay, E., and Gumbleton, M. (2002). Polylysine and polyornithine gene transfer complexes: a study of complex stability and cellular uptake as a basis for their differential in-vitro transfection efficiency. *J Drug Target* 10, 1–9.

Rao, D.D., Vorhies, J.S., Senzer, N., and Nemunaitis, J. (2009). siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 746–759.

Regberg, J., Srimanee, A., Erlandsson, M., Sillard, R., Dobchev, D.A., Karelson, M., and Langel, U. (2014). Rational design of a series of novel amphipathic cell-penetrating peptides. *Int J Pharm* 464, 111–116.

Sebestyén, M.G., Budker, V.G., Budker, T., Subbotin, V.M., Zhang, G., Monahan, S.D., Lewis, D.L., Wong, S.C., Hagstrom, J.E., and Wolff, J.A. (2006). Mechanism of plasmid delivery by hydrodynamic tail vein injection. I. Hepatocyte uptake of various molecules. *J Gene Med* 8, 852–873.

Soomets, U., Lindgren, M., Gallet, X., Hällbrink, M., Elmquist, A., Balaspiri, L., Zorko, M., Pooga, M., Brasseur, R., and Langel, Ü. (2000). Deletion analogues of transportan. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1467, 165–176.

Zhang, G., Budker, V., and Wolff, J.A. (1999). High Levels of Foreign Gene Expression in Hepatocytes after Tail Vein Injections of Naked Plasmid DNA. *Human Gene Therapy* 10, 1735–1737.

Wang, J., Lu, Z., Wientjes, M.G., and Au, J.L.-S. (2010). Delivery of siRNA therapeutics: barriers and carriers. *AAPS J* 12, 492–503.

Veiman, K.-L., Künnapuu, K., Lehto, T., Kiisholts, K., Pärn, K., Langel, Ü., and Kurrikoff, K. (2015). PEG shielded MMP sensitive CPPs for efficient and tumor specific gene delivery in vivo. *Journal of Controlled Release* 209, 238–247.

Veiman, K.-L., Mäger, I., Ezzat, K., Margus, H., Lehto, T., Langel, K., Kurrikoff, K., Arukuusk, P., Suhorutšenko, J., Padari, K., et al. (2013). PepFect14 peptide vector for efficient gene delivery in cell cultures. *Mol. Pharm.* 10, 199–210.

Wong, S.C., Klein, J.J., Hamilton, H.L., Chu, Q., Frey, C.L., Trubetskoy, V.S., Hegge, J., Wakefield, D., Rozema, D.B., and Lewis, D.L. (2012). Co-Injection of a Targeted, Reversibly Masked Endosomolytic Polymer Dramatically Improves the Efficacy of Cholesterol-Conjugated Small Interfering RNAs In Vivo. *Nucleic Acid Ther* 22, 380–390.

Yandek, L.E., Pokorny, A., Florén, A., Knoelke, K., Langel, U., and Almeida, P.F.F. (2007). Mechanism of the cell-penetrating peptide transportan 10 permeation of lipid bilayers. *Biophys. J.* 92, 2434–2444.

Yang, T.T., Sinai, P., Kitts, P.A., and Kain, S.R. (1997). Quantification of gene expression with a secreted alkaline phosphatase reporter system. *BioTechniques* 23, 1110–1114.

Yusa, K., Rashid, S.T., Strick-Marchand, H., Varela, I., Liu, P.-Q., Paschon, D.E., Miranda, E., Ordóñez, A., Hannan, N., Rouhani, F.J., et al. (2011). Targeted gene correction of $\alpha 1$ -antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. *Nature* 478, 391–394.

Kasutatud veebiaadressid

https://www.mirusbio.com/assets/protocols/ml047_plive_in_vivo_expression_and_reporter_vectors.pdf

Lihtlitsents

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Elin Madli Peets

(sünnikuupäev: 09.07.1993)

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

PepFect14 vahendatud nukleiinhapete transport maksa rakkudesse geeni vaigistamiseks,

(lõputöö pealkiri)

mille juhendajad on Kadi-Liis Veiman ja Kaido Kurrikoff,

(juhendaja nimi)

reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.01.2017** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25.05.2015 (*kuupäev*)